

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 10 日 (10.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/056018 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/57, 9/62, 1/15, 1/19, 1/21,
5/00, C12P 21/02, C07K 16/14, G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13627

(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-403261
2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区
霞が関 1-3-1 Tokyo (JP). 独立行政法人製品評価技
術基盤機構 (NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOL-
OGY AND EVALUATION) [JP/JP]; 〒151-0066 東京都
渋谷区西原 2-4 9-1 O Tokyo (JP). 独立行政法人酒
類総合研究所 (NATIONAL RESEARCH INSTITUTE
OF BREWING) [JP/JP]; 〒739-0046 広島県東広島市
鏡山三丁目 7 番 1 号 Hiroshima (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 町田 雅之
(MACHIDA, Masayuki) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つく
ば市東一丁目 1 番 1 号 独立行政法人産業技術
総合研究所つくばセンター第 6 事業所内 Ibaraki
(JP). 阿部 敬悦 (ABE, Keietsu) [JP/JP]; 〒985-0043 宮
城県塩竈市袖野田町 2 4-2 O Miyagi (JP). 五味 勝也 (GOMI, Katsuya) [JP/JP]; 〒989-3201 宮城県仙台
市青葉区国見ヶ丘二丁目 1 1-7 Miyagi (JP). 浅井
潔 (ASAI, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒135-0064 東京都江東区
青海二丁目 4 1 番 6 号 独立行政法人産業技術総合
研究所臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 佐野 元昭
(SANO, Motoaki) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば
市東一丁目 1 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研
究所つくばセンター第 6 事業所内 Ibaraki (JP). 金大
心 (KIN, Taishin) [KR/JP]; 〒135-0064 東京都江東区
青海二丁目 4 1 番 6 号 独立行政法人産業技術総合
研究所臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 長崎 英樹
(NAGASAKI, Hideki) [JP/JP]; 〒135-0064 東京都江東
区青海二丁目 4 1 番 6 号 独立行政法人産業技術総
合研究所臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 細山 哲
(HOSOYAMA, Akira) [JP/JP]; 〒151-0066 東京都渋谷
区西原 2-4 9-1 O 独立行政法人製品評価技術基
盤機構内 Tokyo (JP). 秋田 修 (AKITA, Osamu) [JP/JP];
〒739-0046 広島県東広島市鏡山三丁目 7 番 1 号 独
立行政法人酒類総合研究所内 Hiroshima (JP). 小笠
原 直毅 (OGASAWARA, Naotake) [JP/JP]; 〒630-0243
奈良県生駒市俣口町 2 1 7-1-2 1 O Nara (JP).
久原 哲 (KUHARA, Satoru) [JP/JP]; 〒811-1355 福岡
県福岡市南区桜原七丁目 3 1-1 Fukuoka (JP). 徳
永 税 (TOKUNAGA, Chikara) [JP/JP]; 〒300-0398 茨
城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醱酵工業
株式会社 食品開発研究所内 Ibaraki (JP). 戸田 達
(TODA, Itaru) [JP/JP]; 〒300-0398 茨城県稲敷郡阿見
町阿見 4 0 4 1 協和醱酵工業株式会社 食品開発研
究所内 Ibaraki (JP). 斎藤 知明 (SAITOH, Chiaki) [JP/JP];
〒300-0398 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和
醱酵工業株式会社 食品開発研究所内 Ibaraki (JP). 妹
尾 彰宏 (SENOH, Akihiro) [JP/JP]; 〒194-0021 東京都
町田市 中町三丁目 9-9 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: PYROGLUTAMYL PEPTIDASE AND ITS GENE

(54) 発明の名称: ピログルタミルペプチダーゼおよびその遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a DNA encoding a novel pyroglutamyl peptidase originating in *Aspergillus oryzae*; a pyroglutamyl peptidase produced by using the DNA; and a process for producing a tasty protein degradation product having a high hydrolysis ratio with the use of the pyroglutamyl peptidase.

(57) 要約:

本発明により、アスペルギルス・オリゼに由来する新規なピログルタミルペプチダーゼをコードする DNA、該 DNA を用いて製造されるピログルタミルペプチダーゼ、該ピログルタミルペプチダーゼを利用した、加水分解率の高い風味のすぐれたタンパク質分解物の製造方法が提供される。



(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ピログルタミルペプチダーゼおよびその遺伝子

技術分野

本発明はタンパク質加水分解物の製造に用いられるピログルタミルペプチダーゼおよび該ピログルタミルペプチダーゼをコードする DNA に関する。

背景技術

糸状菌の中でも、特にアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*、黄麹菌) 等を含む麹菌は、清酒、みそ、醤油、及び、みりん等を製造する、わが国における醸造産業において古くから利用され、直接に食されてきた菌類であり、米国の FDA (食品医薬局) により GRAS (Generally Recognized as Safe) にリストアップされている安全な遺伝子源である。このように、糸状菌、特に麹菌は、安全性の点から極めて利用価値の高い遺伝子の宝庫と言える。

タンパク質加水分解物は、タンパク質を含む原料を酸で加水分解することにより製造できるが、タンパク質加水分解物を天然調味料として使用する観点から、酸分解型に加えて酵素分解型のタンパク質加水分解物の製造法が検討されている。酵素分解により製造されるタンパク質加水分解物としては、卵白を酵素分解したもの (特開昭 48-68773)、脱脂大豆を酵素分解したもの (特開昭 51-70852)、チーズホエーを原料として酵素分解したもの (特開昭 62-151155)、コーングルテンミールを酵素分解したもの (特公平 2-295437) などが報告されている。

しかし、タンパク質の性質とタンパク質分解に用いられる酵素によっては生成ペプチドに苦みがあり、官能的に好ましくない場合がある。そこで、加水分解の分解率が高く優れた官能特性を持つ加水分解物が求められている。分解率を向上する技術として、麹菌由来のグルタミナーゼなど各種酵素に関する技術 (WO 99/60104、特開 2000-166547、特表 2002-511746) が検討されている。醤油および味噌の醸造に見られるように、従来の麹菌培養物

を用いた場合、タンパク質の加水分解は多大の労力と時間を要するにも拘わらず、アミノ酸遊離率も低く、特に大豆蛋白中に最も多量に含有され、かつ呈味性に重要なグルタミン酸の遊離率が低い。

ところで、タンパク質やペプチドにはN末端がL-ピログルタミン酸残基で保護されているものが多数存在している。また、タンパク質やペプチドが加水分解された際に、新しく生じたアミノ末端のグルタミンまたはグルタミン酸が非酵素的に閉環してピログルタミン酸残基が形成されることが多く、食品からも検出されている。これらの、N末端がL-ピログルタミン酸残基で保護されているタンパク質やペプチドはそのままではアミノペプチダーゼによる加水分解が進行しないため、該L-ピログルタミン酸残基を除去する操作が必要である。ピログルタミルペプチダーゼは、これらのタンパク質やペプチドのアミノ末端のL-ピログルタミン酸残基を特異的に遊離する酵素であり、種々の動物の脳、肺、血清や脳下垂体及び植物、微生物にも広く存在していることが知られている。タンパク質加水分解酵素を作用させて得たタンパク質加水分解物に、さらにピログルタミルペプチダーゼを作用させて、呈味性のすぐれたタンパク質加水分解物が製造されることが報告されている（特開平8-252075）。

微生物に由来するピログルタミルペプチダーゼとしては、バチルス・アミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens) 由来の酵素 [J. Biochem., 84, 467 (1978)] が知られており、この酵素については遺伝子が単離されて製造方法が報告されている（特開平5-137572）。また、耐熱性の高いピロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) 由来の酵素についても遺伝子が単離されている（特開平7-298881）。また納豆菌 (Bacillus subtilis) 由来の酵素が知られている（特開平8-252075）。しかしながら、糸状菌由来のピログルタミルペプチダーゼおよびその遺伝子については未だ単離されていない。また、タンパク質加水分解物の製造にタンパク質加水分解酵素源としての麹菌の培養物とともにピログルタミルペプチダーゼを使用する場合は、納豆菌等の麹菌以外の異種生物由来のピログルタミルペプチダーゼを使用することにな

るため、高価となり風味も劣ると考えられる。

発明の開示

従来の酵素分解型のタンパク質加水分解物と比較して、アミノ酸遊離率、とりわけグルタミン酸の遊離率が高いタンパク質加水分解物の製造に用いることのできる、糸状菌に由来する新規なピログルタミルペプチダーゼ、該ピログルタミルペプチダーゼの製造に利用できるピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を提供する。

即ち、本発明は以下の各態様に示すポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA に係るものである。本発明のポリペプチドおよび DNA のうち、米国の FDA により GRAS にリストアップされている微生物であるアスペルギルス・オリゼに由来するものは、安全性及び経済性の点から極めて利用価値の高いものである。

本発明は、以下の (1) ~ (23) を提供する。

(1) 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つのポリペプチド。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなり、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチド。

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列は、アスペルギルス・オリゼのピログルタミルペプチダーゼのアミノ酸配列である。

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と全アミノ酸配列にわたってアラインメントして比較した場合に、全体の平均で約 30% 以上、好ましくは約 50% 以上、更に好ましくは約 80% 以上、特に好ましくは約 90% 以上のアミノ酸が同一であるようなアミノ酸配列を意味する。

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 つ以上のアミノ酸が欠失、置

換または付加されたアミノ酸配列とは、好ましくは、1～20 個程度、より好ましくは1～10 個程度、さらに好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列からなるものを意味する。

ポリペプチドのピログルタミルペプチダーゼ活性は、以下のようにして測定できる。5 mmol/l のピログルタミン酸-パラニトロアニリドを含む 50mmol/l リン酸緩衝液 (pH7.5) を基質溶液として調製する。ポリペプチドを含むサンプル溶液を調製し、基質溶液 100 μ l に対し 20 μ l のサンプル溶液を加えて、37°C で 10 分間反応させた後、分光光度計により 405nm の吸光度を測定する。パラニトロアニリンのモル吸光係数 (10500) より、反応時間 1 分あたりのパラニトロアニリンの遊離量を計算し、37°C で 1 分間に 1 μ モルのパラニトロアニリンを遊離する活性を 1 単位とする。

上記の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドは、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、および PCR 法等の当業者に周知の方法を適宜組み合わせて、容易に作成することが可能である。

なお、その際に、実質的に同等の機能を有するためには、当該ポリペプチドを構成するアミノ酸のうち、同族アミノ酸 (極性・非極性アミノ酸、疎水性・親水性アミノ酸、陽性・陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸など) 同士の置換が可能性として考えられる。また、実質的に同等の機能の維持のためには、本発明の各ポリペプチドに含まれる機能ドメイン内のアミノ酸は保持されることが望ましい。

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドの例として、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の N 末に 41 アミノ酸が付加したアミノ酸配列である配列番号 10 で示されるアミノ酸配列

からなるポリペプチドをあげることができる。

(2) (1) に記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA。

(3) 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つの DNA。

(a) 配列番号 1 で示される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 5 で示される塩基配列を含む DNA

(c) 配列番号 1 または 5 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA

(2) および (3) の DNA はピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする領域としての機能を有するものである。これらの DNA がコードするアミノ酸配列の一例は、配列番号 2 で示される。配列番号 2 で示されるアミノ酸配列は、アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株 (FERM P-18273 (FERM BP-7935 に移管)) のゲノム塩基配列に基づき、遺伝子領域 (遺伝子の場所) を特定する為の様々な情報 (ORF、エキソン/イントロン領域、及び、発現配列タグ (EST) 等) に基づき決定されたものである。配列番号 1 で示される塩基配列は、アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株のピログルタミルペプチダーゼ遺伝子、そのプロモーター領域を含むゲノム DNA の塩基配列である。配列番号 5 で示される塩基配列は、配列番号 1 の塩基配列から、5' および 3' の非翻訳領域およびイントロンを除いた塩基配列であり、アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株のピログルタミルペプチダーゼ cDNA のピログルタミルペプチダーゼをコードする領域の塩基配列と一致する。

本明細書において、「ストリンジントな条件下」とは、各塩基配列間の相同性の程度が、例えば、全体の平均で約 80%以上、好ましくは約 90%以上、より好ましくは約 95%以上であるような、高い相同性を有する塩基配列間のみで、特異的にハイブリッドが形成されるような条件を意味する。具体的には、例えば、温度 60℃~68℃において、ナトリウム濃度 150~900mmol/l、好ましくは 600~900mmol/l、pH 6~8 であるような条件をあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。配列番号 1 または 5 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA には、例えば、アスペルギルス・オリゼ以外の糸状菌に由来するピログルタミルペプチダーゼをコードするゲノム DNA、cDNA 等が含まれる。

(4) 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つの DNA。

(a) 配列番号 3 で示される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 3 で示される塩基配列の 100 塩基以上の長さの部分配列を含み、プロモーターとして機能する DNA

(c) 配列番号 3 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、プロモーターとして機能する DNA

これらの DNA の配列は、糸状菌のゲノム DNA において、本発明のポリペプチドをコードする領域、たとえば配列番号 1 で示される塩基配列 1001~1111 番目の塩基配列の 5' 上流に位置するものである。

これらの中には、その 3' 下流領域にあるコード領域において EST が現実に確認されている（発現条件：2%グルコースを含む完全液体培地による培養、2%マルトースを含む完全液体培地による培養、炭素源を含まない合成液体培地による培養、2%グルコースを含む完全液体培地を用いた高温（37℃、他は特に指示のない限り 30℃）での培養、固体培養（小麦ふすま）での培養、2%グルコースを含むアルカリ性（pH 10）合成培地での培養、ポテトデキストロース寒天培地上で 28℃で胞子を 8 日間培養した発芽直後の培養、あるいは、大豆・小麦混合培地で 34 時間培養後 25℃で 3 時間の固体培養のいずれか）ことから明らかなように、プロモーター領域（コアプロモーター又は基本プロモーター、及び上流プロモ-

ター要素等の、各種ポリメラーゼ、基本転写因子又は転写因子と相互作用する配列)を含むものがある。

従って、このようなプロモーター領域を含み得る部分配列としては、例えば、上記各配列の 3' 側から、好ましくは 200 塩基対以上、より好ましくは 500 塩基対以上、更に好ましくは 800 塩基対以上、特に好ましくは 900 塩基対以上のものが適当である。あるいは、上記各配列中の適当な中間部分において上記の長さの塩基対を有する部分配列をあげることができる。

DNA がプロモーターとして機能するかどうかは、例えば以下のような方法で確認できる。レポーターとなるポリペプチドをコードする DNA の上流に、試験する DNA をつなげた DNA を調製して、アスペルギルス・オリゼのアセトアミダーゼ遺伝子または硝酸還元酵素遺伝子等の形質転換マーカー遺伝子を有する適当なベクター [J. Ferment. Bioeng., 74, 389 (1992)、Mol. Gen. Genet., 218, 99-104 (1989)] に挿入し、組換えベクターを作製する。得られた組換えベクターを用いて、文献 [J. Ferment. Bioeng., 74, 389 (1992)、Mol. Gen. Genet., 218, 99-104 (1989)] に記載の方法でアスペルギルス・オリゼを形質転換し、形質転換体において、レポーターとなるポリペプチドを測定する。該ポリペプチドが検出された場合は、レポーターとなるポリペプチドをコードする DNA の上流につなげた DNA がプロモーターとして機能することが確認される。レポーターとなるポリペプチドとしては、Escherichia coli の β -グルクロニダーゼ、グリーン蛍光蛋白質、Escherichia coli の β -ガラクトシダーゼ等をあげることができる。形質転換体またはその培養上清における β -グルクロニダーゼ、グリーン蛍光蛋白質、 β -ガラクトシダーゼは文献 [Appl. Environ. Microbiol. 61, 2482 (1995)、Eur. J. Biochem. 266, 252 (1999)、Mol. Microbiol. 8, 211 (1993)] に記載の方法で検出することができる。

(4) の DNA は、さらに、例えば、外来遺伝子等を挿入して発現させるための領域としての有用性を有する。

(5) 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つの DNA。

- (a) 配列番号 4 で示される塩基配列と相補的な塩基配列を含む DNA
- (b) 配列番号 4 で示される塩基配列と相補的な塩基配列の 10 塩基以上の長さの部分配列を含む DNA
- (c) 配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA

この DNA は、アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株のゲノム DNA においては配列番号 1 で示される塩基配列の 1902～2201 番目の塩基配列を有する 3' 非翻訳領域の DNA であり、特に配列番号 1 で示される塩基配列を有するピログルタミルペプチダーゼ遺伝子から転写される mRNA とハイブリッドさせてそれらを検出する際のプローブとして使用することができる。該 mRNA の、配列番号 5 で示される塩基配列に相当する、ピログルタミルペプチダーゼをコードする領域は、コードするポリペプチドの機能と関連して往々にして他の mRNA と相同性の高い配列を含むのに対して、この部分の塩基配列は、配列番号 5 と何ら関りのない任意性の高い配列からなる。したがって、(5) の DNA をプローブとして使用することによって、細胞から抽出した RNA の集団の中から、ピログルタミルペプチダーゼの mRNA を極めて高い特性を持って分別検出および定量することが可能である。また、この領域内の配列を有する PCR のプライマーを作製することにより、PCR によっても分別検出および定量することが可能である。

そのようなプローブとして使用する本発明の DNA 又はその部分配列の領域としては、上記配列の 5' 側から、好ましくは 300 塩基の範囲、より好ましくは 200 塩基対の範囲、特に好ましくは約 100 塩基対の範囲が適当である。又、部分配列の長さは、使用目的等に応じて、当業者が適宜選択することができるが、検出及び定量感度の点からは、上記各範囲において、一般的に長い程良い。

(6) DNA がゲノム DNA である、(2) ～ (5) のいずれか 1 項に記載の DNA。

(7) (2) ～ (6) のいずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列または該塩基配列と相補的な塩基配列の、連続する 15 塩基以上の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド。

(8) (2) または (3) に記載の DNA を含有する組換え体 DNA。

(9) (8) に記載の組換え体 DNA を含む形質転換体。

(10) (1) に記載のポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法。

(11) 微生物が、(9) に記載の形質転換体である (10) に記載の製造方法。

(12) 微生物が、糸状菌である (10) に記載の製造方法。

(13) 糸状菌が、アスペルギウス属、ペニシリウム属、フミコウラ属、トリコデルマ属、ムコール属およびフザリウム属からなる群から選択される 1 つの属に属する糸状菌である (12) に記載の製造方法。

(14) アスペルギルス属に属する糸状菌が、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・パラシテイクス、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウス、アスペルギルス・フミガタスおよびアスペルギルス・ニジュランズからなる群から選択される 1 つの種に属する糸状菌である (13) に記載の製造方法。

(15) タンパク質を含む原料に、(1) に記載のポリペプチドおよびタンパク質加水分解酵素を添加して、タンパク質を分解することを特徴とするタンパク質加水分解物の製造方法。

(16) タンパク質を含む原料に、(1) に記載のポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培地に培養して得られる、(1) に記載のポリペプチドを含む培養物または該培養物の処理物、およびタンパク質加水分解酵素を添加して、タンパク質を分解することを特徴とするタンパク質加水分解物の製造方法。

(17) 微生物が、(9) に記載の形質転換体である (16) に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

(18) 微生物が、糸状菌である (16) に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

(19) 糸状菌が、アスペルギウス属、ペニシリウム属、フミコーラ属、トリコデルマ属、ムコール属およびフザリウム属からなる群から選択される1つの属に属する糸状菌である(18)に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

(20) アスペルギルス属に属する糸状菌が、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・パラシテイクス、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウス、アスペルギルス・フミガタスおよびアスペルギルス・ニジュランスからなる群から選択される1つの種に属する糸状菌である(19)に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

(21) (15) から(20) のいずれか1項に記載の方法により製造されるタンパク質加水分解物。

(22) (1) に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

(23) (22) に記載の抗体を用いて(1) に記載のポリペプチドを検出または定量する方法。

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の DNA の調製

本発明の DNA としては、例えば配列番号 1 で示される塩基配列を含む DNA は、アスペルギルス・オリゼのゲノムを出発材料として用いて、例えば、実施例で記載したショットガン・クローニング法によって調製することができる。その際、断片化された各染色体 DNA は、その長さ等に応じて、プラスミドベクターまたはファージ等の適当なクローニングベクターに連結し、これを用いてエレクトロポレーション法等の適当な方法によって大腸菌等の適当な宿主細胞を形質転換し、該断片化各染色体 DNA をクローニングするための、クローンライブラリーを調製することができる。

さらに、化学分解法(マキサムーギルバート法)及びジデオキシ法等の公知の方法に従って、かかるクローンライブラリーから得られる断片化各染色体 DNA

の塩基配列を決定することができる。

また、配列番号 1 または 5 で示される塩基配列または該塩基配列と相補的な塩基配列の、連続する 15 塩基以上の塩基配列を含むオリゴ DNA をプライマーとして使用した PCR により増幅して調製することもできる。例えば、配列番号 8 および 9 で示された塩基配列を有するオリゴ DNA をプライマーセットとして用い、アスペルギルス・オリゼの cDNA をテンプレートとして PCR を行うことにより、配列番号 5 で示される塩基配列を含む DNA を増幅し、単離することができる。

また、本発明の DNA の塩基配列の連続する 15 塩基以上の塩基配列を含むオリゴ DNA および本発明の DNA の塩基配列と相補的な塩基配列の連続する 15 塩基以上の塩基配列を含むオリゴ DNA をプライマーセットして、PCR を行うことにより、本発明の DNA の断片を増幅し、検出または単離することができる。プライマーは、増幅する領域を選択し、好ましくは、その領域の 5' 端 15~50 塩基の配列を 3' 端に含む DNA および、この領域の 3' 端 15~50 塩基の配列と相補的な配列を 3' 端に含む DNA を作製して用いる。テンプレートとしては、例えば微生物、好ましくは糸状菌の染色体 DNA あるいは cDNA を用いることができる。糸状菌としては、好ましくは、アスペルギルス属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フミコーラ (Humicola) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、ムコール (Mucor) 属およびフザリウム (Fusarium) 属から選択されるいずれか 1 つ属に属する微生物をあげることができ、特に好ましくは、アスペルギルス属に属する糸状菌をあげることができる。アスペルギウス属に属する糸状菌としては、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus)、アスペルギルス・フラバス (Aspergillus flavus)、アスペルギルス・ソーヤ (Aspergillus sojae)、アスペルギルス・パラシテイクス (Aspergillus paraciticus)、アスペルギルス・ノミウス (Aspergillus nomius)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori)、アスペルギルス・カワチ (Aspergillus kawachii)、アスペルギルス・ニドランス (Aspergillus nidulans) があげられ、好ましくはフラビ節に属するものがあ

げられる。フラビ節に属するアスペルギルス属糸状菌としては、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・パラシテイクス、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウスがあげられる。このうち、例えばアスペルギウス・オリゼ RIB 40 株 (ATCC 番号: 42149) は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東一丁目 1-1 中央第 6) に平成 13 年 3 月 28 日付けで FERM P-18273 として寄託されており、さらに平成 14 年 3 月 4 日に国際寄託として FERM BP-7935 に移管されている。

配列番号 3 または 4 で示される塩基配列を含む DNA は、配列番号 1 で示される塩基配列を含む DNA の部分断片であり、アスペルギルス・オリゼのゲノム DNA をテンプレートとして、配列番号 3 または 4 で示される塩基配列に基づくプライマーセットを用いて PCR を行うことにより、増幅し、単離することができる。

PCR は当業者に周知の条件及び手段を用いて、行うことができるが、PCR の反応条件としては、例えば、94℃で 2 分の反応の後、94℃で 10 秒、55℃で 20 秒、72℃で 2 分からなる反応サイクルを 30 サイクル行い、最後に 72℃で 5 分反応させる条件、94℃で 5 分間の反応の後、94℃で 2 分、56℃で 30 秒、72℃で 1 分 30 秒からなる反応サイクルを 30 サイクル行う条件があげられる。なお、サーマルサイクラーとしては、Perkin Elmer 社製 9600、アステック社製プログラム・テンプ・コントロール・システム PC-700 など一般のサーマルサイクラーを用いることができる。耐熱性 DNA ポリメラーゼとしては、Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) ExTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) などの一般の市販品を用い、反応液の組成はポリメラーゼに添付の説明書に従って実施することができる。

上記の DNA の増幅用プライマーセットに用いる各プライマーの塩基の長さに特に制限はなく、その使用目的等に応じて当業者が適宜選択することができるが、通常、15~50 塩基、好ましくは 20~30 塩基の長さである。プライマーの数は、増幅の対象となる DNA が含まれる菌種の麴菌との近縁度及び混在度を考慮して最小限の数を決定することができるが、少なくとも 1 組 (2 本)、好ましくは 2~4 組である。また、プライマーの設計に当っては、増幅する対象となる配列の長

さ、特徴等を考慮する。オリゴ DNA は当業者に周知の化学合成、例えば、アプライド・バイオシステムズ社製の DNA 合成装置等を使用して調製することができる。

本発明の DNA の部分断片、あるいは本発明の DNA の塩基配列または本発明の DNA の塩基配列と相補的な塩基配列の連続する 15 塩基以上の塩基配列を含むオリゴ DNA を放射性同位体、ジゴキシゲニン、ビオチン等で標識したものをプローブとして、ハイブリダイゼーションにより、本発明の DNA、本発明のポリペプチドをコードする mRNA を検出することができる。本発明の DNA の部分断片は、上記に記載した PCR により調製することができ、オリゴ DNA はプライマーに用いるオリゴ DNA と同様に化学合成や DNA 合成装置により調製できる。プローブの長さは、検出対象などに応じて当業者が適宜選択することができるが、通常、15～3000 塩基、好ましくは 20～1000 塩基の長さである。

ハイブリダイゼーションは、例えば、電気泳動ゲルあるいはコロニーなどから DNA あるいは mRNA をニトロセルロースあるいはナイロンメンブレン上に転写し、真空中で 80℃、2 時間反応させるかあるいは紫外線照射処理することによって、DNA をメンブレン上に固定化する。この時、必要に応じて 0.5mol/l NaOH、1.5mol/l NaCl を含むアルカリ性溶液を用いた変性および 0.5mol/l Tris-HCl (pH 7.5)、3mol/l NaCl の溶液を用いた中和を行う。このメンブレンを 50% フォルムアミド、4×SSC、50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0)、10×Denhardt's 溶液、100 μg/ml サケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーション溶液で、42℃、2 時間プレハイブリを行った後、上記プローブを添加した同ハイブリダイゼーション溶液で、42℃、一昼夜ハイブリダイゼーションを行う。このメンブレンを、0.1% SDS を含む 2×SSC 溶液で室温、2 分間で 3 回洗浄した後、0.1% SDS を含む 0.1×SSC 溶液中で 50℃、2 時間で 3 回洗浄する。洗浄後のメンブレンは風乾した後、-70℃で 2 時間から一昼夜、X 線フィルムに露光させ、現像して可視化する。また、基板上にオリゴ DNA または DNA 断片を固定化し、標識した mRNA あるいは DNA とハイブリダイズさせた後、ドットとして検出する DNA チップ [Genome Res., 6, 639 (1996)] によっても本発明の DNA または本発明のポリペプチドを

コードする mRNA を検出することができる。

(2) 本発明のポリペプチドの製造

本発明のポリペプチドは、例えば以下の方法により、本発明のポリペプチドをコードする DNA を含む組換え体 DNA を宿主細胞に導入した形質転換体を作製し、該形質転換体を培養することにより、製造することができる。具体的な遺伝子操作的手法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory (2001)や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)等に記載された方法等を用いることができる。

(1) で得られた本発明の DNA から、本発明のポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さの DNA を調製する。また、必要に応じて、本発明のポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主細胞の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換した DNA を調製する。

該 DNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入する。

宿主細胞としては、細菌、酵母、糸状菌、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、本発明のポリペプチドをコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチドをコードする DNA を含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のポリペプチドをコードする DNA および転写終結配列が連結された構造を含むベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-30 (キアゲン社製)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric.

Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pTrS30 [Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pGEX-5X-3 (アマシャム・バイオサイエンス社製)、pET14 (ノバジェン社製)、pPROTet.E (クロンテック社製) pRSET C (インビトロジェン社製) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P_{trp})、lac プロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7 プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター ($P_{trp} \times 2$)、tac プロモーター、lacT7 プロモーター、let I プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli BL21、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No. 49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli GI698、Escherichia coli TB1、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、

Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066 、 Brevibacterium flavum ATCC14067 、 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 、 Corynebacterium glutamicum ATCC13032 、 Corynebacterium glutamicum ATCC13869 、 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、 Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、 Pseudomonas putida 、 Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)] 、プロトプラスト法 (特開昭 63-2483942) 、または Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115) 、YEp24 (ATCC37051) 、YCp50 (ATCC37419) 、pHS19、pHS15 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、Saccharomyces 属、Schizosaccharomyces 属、Kluyveromyces 属、Trichosporon 属、Schwanniomyces 属、Pichia 属、Candida 属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Candida utilis 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)] 、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75,

1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)に記載の方法等をあげることができる。

糸状菌を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば pPTRI (白鶴酒造社製)、pPTRII (白鶴酒造社製)、pAUR316 (宝酒造社製)等をあげることができる。

プロモーターとしては、糸状菌株中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば amyB プロモーター、enoA プロモーター、gpd プロモーター、mel0 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては Aspergillus 属、Penicillium 属、Tricoderma 属、Fusarium 属、Humicola 属、Mucor 属等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては糸状菌に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、プロトプラスト法 [GENETICS of ASPERGILLUS NIDULANS: EMBO Practical Course Manual, 8 (1988)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pEGFP-C2 (クロンテック社製)、pAGE107 (特開平 3-22979; Cytotechnol., 3, 133 1990)、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pCMV-Tag1 (ストラタジーン社製)、pcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pMSG (アマシャム・バイオサイエンス社製)、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)] 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞

である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299) 等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973) 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)、Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに該組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBac4.5 (ともにインビトロジェン社製)、pBacPAK9 (クロンテック社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヤガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクタ

ーと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Ti プラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium)（特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭 60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（特許公報 2606856 号、特許公報 2517813 号）等をあげることができる。

以上のようにして得られる本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物あるいは酵母、糸状菌等の真核微生物を宿主として得られた形質転換体である場合、該形質転換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、

フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、小麦蛋白質および小麦蛋白質加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3.0～9.0 に保持することが好ましい。pH の調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI 1640 培地 [J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM (Minimum Essential Medium) [Science, 122, 501 (1952)]、Dalbecco

改変 Eagle 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6 ~ 8、30 ~ 40°C、5 %CO₂ 存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (ファーミンジェン社製)、Sf-900 II SFM 培地 (インビトロジェン社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH バイオサイエンス社製)、Grace の昆虫培地 [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6 ~ 7、25 ~ 30°C 等の条件下で、1 ~ 5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 5 ~ 9、20 ~ 40°C の条件下で 3 ~ 60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明のポリペプチドをコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

酵母、糸状菌、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、または特開平 5-336963、W094/23021 等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

また、公知の方法 [J. Biomol. NMR, 6, 129 (1998)、Science, 242, 1162 (1988)、J. Biochem., 110, 166 (1991)] に準じて、in vitro 転写・翻訳系を用いて本発明のポリペプチドを生産することができる。すなわち、本発明のポリペプチドをコードする DNA を SP6、T7、T3 等のプロモーターの下流につなげ、それぞれのプロモーター特異的な RNA ポリメラーゼを反応させることにより大量の本発明のポリペプチドをコードする RNA をインビトロで合成した後、無細胞系の翻訳系例えばウサギ網状赤血球ライセートやコムギ胚芽抽出液を用いた翻訳系を利用して、本発明のポリペプチドを生産することができる。

本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離精製法を用いることができる。例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収

し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia 社製）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。pRSET 系ベクター（インビトロジェン社製）、pGEX 系ベクター（アマシャム・バイオサイエンス社製）等、該ポリペプチドにタグをつけて発現させた場合、ニッケルレジン、グルタチオンセファロースなどの適当な担体を用いてアフィニティ精製することもできる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてポリペプチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中のポリペプチド変性剤の濃度を下げることにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチド、あるいは該ポリペプチドに糖鎖の付加されたポリペプチド等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいは該ポリペプチドの誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される本発明のポリペプチドとして、例えば、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをあげることができる。

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アプライド・バイオシステムズ社、Advanced ChemTech 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培養することによっても製造することができる。微生物としては、本発明のポリペプチドを生産する能力を有する微生物であれば、いかなる微生物を用いてもよく、好ましくは糸状菌、さらに好ましくはアスペルギウス属、ペニシリウム属、フミコーラ属、トリコデルマ属、ムコール属およびフザリウム属からなる群から選択される 1 つの属に属する糸状菌、さらに好ましくは、アスペルギルス属に属する糸状菌であるアスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・パラシティクス、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウス、アスペルギルス・フミガタスおよびアスペルギルス・ニジュランスからなる群から選択される 1 つの種に属する糸状菌を用いることができる。さらに、本発明のポリペプチドを生産する能力を有する微生物は、野生株、形質転換体、突然変異株等いずれであってもよいが、形質転換、突然変異処理等を行って、本発明のポリペプチドを生産する能力が増大した微生物が好ましい。なお、突然変異の処理方法としては、紫外線照射や、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンなどの突然変異誘発剤による処理があげられる。微生物の培養およびポリペプチドの精製は、上記の微生物の形質転換体の培養およびポリペプチドの精製と同様に行なうことができる。

(3) タンパク質加水分解物の製造方法

タンパク質を含む原料に、本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドおよびタンパク質加水分解酵素を添加して混合し、通常 20℃～60℃、好ましくは 30℃～50℃にて 24～264 時間、好ましくは 48～240 時間反応させることにより、タンパク質加水分解物を製造することができる。また、タンパク質を含む原料に最初にタンパク質加水分解酵素を添加して混合し、通常 20℃～60℃、好ましくは 30℃～50℃にて、24～264 時間、好ましくは 48～240 時間反応させてタンパク質の加水分解反応を行なった後、本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを添加して混合し、さらに通常 20℃～60℃、好ましくは 30℃～50℃にて、5～96 時間、好ましくは 12～72 時間反応させることによっても、製造することができる。後者の場合、本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを添加する際にさらにタンパク質加水分解酵素を添加して反応させてもよい。反応時の pH は、本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドおよびタンパク質加水分解酵素が作用できる pH であればよいが、好ましくは pH5～8 に調整する。

この製造方法で用いる、ピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドとしては、上記（2）に記載した方法で精製したポリペプチドを用いることもできるし、ポリペプチドを精製せずに、上記（2）に記載した本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含有する組換え体 DNA を含む上記の形質転換体、または本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培地に培養して得られる、本発明のピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドを含む培養物または該培養物の処理物を用いることもできる。

タンパク質加水分解酵素としては、フレーバーザイム（ノボノルディスク社製）、麴菌の培養物等を用いることができる。麴菌としては、醸造工業で用いられるものであれば、いかなる種類の麴菌でもよいが、例えば、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ等をあげることができる。本発明の製造方法に用いる原料に含まれるタンパク質は、特に限定されないが、グルタミン酸含量の

高いものが好ましい。また、タンパク質を含む原料は、タンパク質を多く含むものであればよく、精製したタンパク質である必要はない。例えば、小麦グルテン、脱脂大豆、分離大豆タンパク質等があげられる。反応終了後、未反応の原料タンパク質、菌体などを除去後、必要に応じて濃縮、乾燥することにより加水分解率の高いタンパク質加水分解物を得ることができる。

(4) 本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体の製造

(a) ポリクローナル抗体の調製

上記(2)に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片の精製標品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として用い、動物を免疫することにより、本発明のポリペプチドと特異的に結合するポリクローナル抗体を作製することができる。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を抗原に結合させて投与する、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

抗原とするペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBOC 法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法あるいは、アプライド・バイオシステムズ社、Advanced ChemTech 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することができる。

キャリアタンパク質としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン（Keyhole limpet hemocyanin）、ウシ血清アルブミン、ウシチログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血して血清を調製し、該血清が免疫に用いた抗原

と反応することを酵素免疫測定法 (ELISA) [酵素免疫測定法 (第 3 版)、医学書院 (1987); Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)] 等で確認する。抗原の投与量は動物 1 匹に投与 1 回当たり 50~200 μ g が好ましい。

免疫に用いた抗原に対し、血清が十分な抗体価を示した動物より全血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)]、または DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A または G カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(b) モノクローナル抗体の調製

(i) 抗体産生細胞の調製

上記(a)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したマウスまたはラットに抗原物質を最終投与した後 3~7 日目に、脾臓を摘出する。該脾臓を MEM (Minimum Essential Medium) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200 r p m で 5 分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1~2 分間処理し赤血球を除去した後、MEM で 3 回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(ii) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c 由来) 骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 [Nature, 256, 495 (1975)] 等を

用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI 1640 培地に 1.5mmol/L グルタミン、50 μ mol/L 2-メルカプトエタノール、10 μ g/mL ゲンタマイシンおよび 10% ウシ胎児血清を加えた培地（以下、正常培地という）に、さらに 15 μ g/mL 8-アザグアニンを加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(iii) ハイブリドーマの作製

(i) で取得した抗体産生細胞と (ii) で取得した骨髓腫細胞を MEM または PBS (1.83g/L リン酸二ナトリウム、0.21g/L リン酸一カリウム、7.65g/L NaCl, pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞＝5～10：1になるよう混合し、1,200rpm で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、108 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 2g、MEM 2mL およびジメチルスルホキシド 0.7mL を混合した溶液を 0.2～1 mL 添加し、更に1～2分間毎に MEM 1～2 mL を数回添加する。添加後、MEM を加えて全量が 50mL になるように調製する。該調製液を 900rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地に 0.4mmol/L ヒポキサンチン、15 μ mol/L チミジンおよび 0.4 μ mol/L アミノプテリンを加えた培地〕100mL 中に懸濁する。該懸濁液を 96 穴培養用プレートに 100 μ L/穴ずつ分注し、5% CO₂ インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとり、ELISA により、培養上清中の本発明のポリペプチドに結合する抗体を検出することにより、本発明のポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択する。

ELISA の具体的例として、以下の方法をあげることができる。免疫の際、抗原に用いたポリペプチドまたはペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (iv) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ等の酵素で標識し

た抗マウスイムノグロブリン抗体（抗体産生細胞がラット由来の場合は抗ラットイムノグロブリン抗体）を反応させる。標識酵素により発色する基質を添加して反応を行ない、抗原と結合した第一抗体を検出する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目は、HT 培地（HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(iv)モノクローナル抗体の調製

プリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）0.5mL を腹腔内投与し、2週間飼育した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(iii)で取得した本発明のポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpm で5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナル抗体の精製で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(5) 本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を用いた本発明のポリペプチドの検出および定量法

(4)で得られる本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出および定量することができる。測定試料としては、細胞の抽出液や培養上清等が用いられる。

免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、ELISA、放射性物

質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法や免疫細胞染色法、イムノブロット法、ドットブロッキング法、免疫沈降法、サンドイッチ ELISA〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック）（1987）、続生化学実験講座 5、免疫生化学研究法（東京化学同人）（1986）〕等が挙げられる。

蛍光抗体法とは、測定試料に、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質で標識した該抗体と結合する抗体（例えば本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体がマウス抗体の場合は抗マウス IgG 抗体あるいはその断片等）を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定することにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

ELISA とは、測定試料に、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ等の酵素で標識した該抗体と結合する抗体を反応させた後、標識した酵素により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を分光光度計で測定することにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

RIA とは、測定試料に、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を反応させ、さらに放射性標識を施した該抗体と結合する抗体を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで放射エネルギーを測定することにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、細胞や組織切片等の測定試料に、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの標識を施した該抗体と結合する抗体を反応させた後、顕微鏡を用いて観察することにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

イムノブロット（ウェスタンブロット）法とは、測定試料を SDS-PAGE〔Antibodies- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕で分画した後、該ゲルを PVDF 膜あるいはニトロセルロース膜にブロッキングし、該膜に本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を反応させ、

さらに FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの標識を施した該抗体と結合する抗体を反応させた後、標識物質に応じた反応を行うことにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

ドットブロッキング法とは、測定試料をニトロセルロース膜にブロッキングし、該膜に本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を反応させ、さらに FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの標識を施した該抗体と結合する抗体を反応させた後、標識物質に応じた反応を行うことにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

免疫沈降法とは、測定試料を本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体と反応させた後、プロテイン A-セファロース等イムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を形成させ、分離することにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

サンドイッチ ELISA とは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を吸着させたプレートに、測定試料を反応させた後、ペルオキシダーゼ等の酵素で標識した本発明のポリペプチドと特異的に結合し、上記抗体とは抗原認識部位が異なる抗体を反応させ、標識した酵素により発色する基質を加えて反応させ、発色色素を分光光度計で測定することにより本発明のポリペプチドを検出する方法である。

(2) に記載の方法で調製できる本発明のポリペプチドの精製標品の一定濃度の溶液を作製し、これを段階的に希釈したものを上記の検出方法で測定する。各濃度の標品の測定値から検量線を作成し、測定試料の測定値を比較することにより、本発明のポリペプチドの定量を行うことができる。

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、実施例における各種遺伝子操作は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) に記載されている方法に従った。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 ホールゲノムショットガンライブラリーの作製方法

1. インサート DNA の調製

(1) 染色体 DNA の取得

糸状菌アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株 (ATCC 番号: 42149) の胞子を YPD 培地 (0.5% イーストエキス、1% ペプトン、2% グルコース) に植菌し、30℃ で一晚振盪培養した。その後、飯村の方法 [Agric. Biol. Chem., 51, 323 (1987)] に従ってゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA に混在しているミトコンドリア DNA を Watson らの方法 [Methods Enzymol., 118, 57 (1986)] に従って染色体 DNA のみになるよう塩化セシウム超遠心による精製を行った。

(2) 染色体 DNA の断片化

取得した純粋な染色体 DNA をランダム DNA 断片化装置 HydroShear (トミー精工) にかけて、染色体 DNA を 1 ~ 2 kb 程度に断片化した。

(3) 断片化した DNA の末端処理

断片化した染色体 DNA を BAL31 ヌクレアーゼ (宝酒造) で処理し、その後クレノー断片 (宝酒造) 処理を行い、末端を平滑化した。

(4) 末端へのアダプターの付加

末端を平滑化した染色体 DNA 断片の両端に、5' 末端をリン酸化した配列番号 6 および 7 で示される塩基配列からなる DNA をアダプターとして、T4 DNA リガーゼ (宝酒造) を用いて連結した。

2. ベクターへのインサート DNA の挿入と形質転換

pUC19 を制限酵素 SalI (宝酒造) により切断を行った後、チミジン残基を Taq DNA ポリメラーゼ (ロシュ・ダイアグノスティクス) により SalI 切断部分に挿入した。このようにして作製したプラスミドをアルカリ・ホスファターゼ (宝酒造) 処理により脱リン酸化しベクターとして利用した。ベクターと上記で作製した染色体 DNA 断片を T4 DNA リガーゼを用いて連結させ、大腸菌 DH10B (Gibco) にエレクトロポレーション法により形質転換を行った。

3. 塩基配列の決定

大腸菌形質転換体を 2×YP 培地で 37℃、10 時間培養し、集菌後、滅菌水中で 99℃、10 分間加熱処理した。この上澄を鋳型 DNA 水溶液として用い、98℃で 20 秒、68℃で 2 分の 30 サイクルの PCR によって、シーケンス用プライマーがアニールする部位を含む挿入断片全長を増幅した。得られた DNA 断片は、サンガー法の鋳型として用い、M13 ユニバーサルプライマーあるいは M13 リバースプライマーと、Perkin Elmer 社製 PRISM Dye-Terminator シークエンシングキットを用いて、キットに添付の説明書に従ってシーケンス反応を行った。シーケンス反応産物は、ゲルろ過法などを用いて未反応の Dye-terminator を除去した後、Perkin Elmer 社製 3700 DNA シークエンサーを用いて、DNA 断片の塩基配列を解読した。3700 DNA シークエンサーによって出力された波形データは、Phred (Phil Green) で再解析し、ベクター及びアダプター配列を除去した後、SPS Phrap (Southwest Parallel Software 社) を使用してアッセンブルし、アスペルギルス・オリゼ RIB-40 株のゲノム DNA の塩基配列のコンティグを構築した。

実施例 2 遺伝子の特定

ゲノム DNA の塩基配列からの遺伝子の特定は、ゲノム DNA の塩基配列のコンティグに対し、すでに取得した EST の配列情報、既知のタンパク質アミノ酸配列データベースとの相同性情報を考慮しながら、浅井潔らによるアルゴリズム [Pacific Symposium on Biocomputing, 98, 228 (1998)] に基づく遺伝子領域予測システム GeneDecoder と後藤修によるアルゴリズム [Bioinformatics, 16, 190-202 (2000)] に基づく遺伝子領域予測システム ALN を組み合わせて、以下の (1) ~ (7) の方法により行なった。

(1) BLAST 相同性遺伝子候補領域の抽出

ゲノム DNA 塩基配列のコンティグから既知のタンパク質アミノ酸配列と高い相同性をもつ領域を抽出する。アミノ酸配列の相同性は Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2264 (1990)、Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 90, 5873 (1993)] によって決定することができ

るが、このアルゴリズムに基づいて、BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されており [J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990)]、ゲノム DNA 塩基配列がアミノ酸配列に翻訳された場合に相同性が高い領域を直接検索することができる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。本手法では、ゲノム DNA 塩基配列のコンティグを問い合わせ配列、SWISSPROT バージョン 39 [Nucleic Acids Res., 28, 45 (2000)] および NRaa をデータベースとして BLASTX の検索を行い、BLAST アルゴリズムにおける相同性の指標である E-value で 10^{-30} 以下の値を持つ (E-value は値が低いほど相同性が高いことを示す) 領域を抽出する。これらの領域から、より相同性の高い部分を優先させるようにして抽出した、互いに重ならない遺伝子候補領域を、BLAST 相同性遺伝子候補領域とした。

(2) ALN 遺伝子候補領域の抽出

BLAST 相同性遺伝子候補領域のうち、相同性の対象となるタンパク質のアミノ酸配列の全長の 90%以上の領域に対して相同性をもつものを核として、コンティグ配列に対して遺伝子領域予測システム ALN を適用して抽出した遺伝子候補領域を、ALN 遺伝子候補領域とした。ALN は、相同性の対象となるタンパク質アミノ酸配列の全長を、コンティグに対して整列させながらスプライス部位を特定することにより、遺伝子領域を予測する。

(3) GD 相同性遺伝子候補領域の抽出

BLAST 相同性遺伝子候補領域のうち、相同性の対象となるタンパク質のアミノ酸配列の残基長の 20%以上 90%未満の領域に対して相同性をもつものを核として、コンティグ配列に対して遺伝子領域予測システム GeneDecoder を適用して抽出した遺伝子候補領域を、GD 相同性遺伝子候補領域とした。GeneDecoder は、BLASTX の E-value と、タンパク質コード領域の指向性の指標である 2 連コドン統計量を統合し、さらにスプライス部位の位置依存 1 次マルコフモデルによるスコアを考慮して遺伝子領域を予測する。

(4) EST-GD 遺伝子候補領域の抽出

コンティグ配列に対応した EST によって遺伝子発現が確認されている領域については、その付近のコンティグ配列に GeneDecoder を適用することにより、EST の配列によって決定される遺伝子領域のみならず、遺伝子領域全体を予測して抽出した遺伝子候補領域を、EST-GD 遺伝子候補領域とする。

(5) 一般 GD 遺伝子候補領域の抽出

(1) から (4) までの遺伝子候補領域に含まれないコンティグ配列に対して、GeneDecoder を適用することにより、遺伝子領域を予測して抽出された遺伝子候補領域を、一般 GD 遺伝子候補領域とする。

(6) tRNA 遺伝子候補領域の抽出

tRNA-scan を全コンティグに適用することにより、抽出された tRNA 遺伝子候補を tRNA 遺伝子候補領域とする。

(7) 遺伝子候補領域の統合

以下の手順により、(2) から (6) までの遺伝子候補領域を統合する。まず、(2) から (6) までの遺伝子候補領域のうち、EST によって決定されるスプライス部位と矛盾した遺伝子領域を予測するものは取り除かれる。残った遺伝子候補領域を、互いに重なるものを取り除くことによって統合する。その際、tRNA 遺伝子候補領域、ALN 相同性遺伝子候補領域、GD 相同性遺伝子候補領域、GD-EST 遺伝子候補領域、一般 GD 遺伝子候補領域の順で優先させて統合する。この統合された遺伝子候補領域を、予測遺伝子のセットとする。配列番号 1 で示される塩基配列は、このようにして得られた予測遺伝子のうちの 1 つの塩基配列である。

以上の手順により、相同性の観点からは、既知タンパク質の全長にわたって相同性をもつ遺伝子、既知タンパク質と部分的に相同性をもつ遺伝子、既知タンパク質と相同性をもたない遺伝子がこの順に従った信頼性で特定されることが保証される。また、発現の確認の観点からは、EST で発現が確認されている遺伝子、EST で発現が確認されていない遺伝子の順に従った信頼性で特定され、また、すべての候補遺伝子が EST によって特定されるスプライス部位と矛盾しないことが保証される。

用いられた手法はすべて終始コドンタンパク質コード領域中に含むことを許さないアルゴリズムを採用しており、偽遺伝子を遺伝子として予測する可能性は少ない。

機能決定に関しては、予測された遺伝子領域に対して、Nr_{aa} をデータベースとする BLAST による相同性検索を行い、機能を特定するために十分な相同性 (E-value で 10^{-30}) を閾値として機能を決定した。

さらにこの予測遺伝子の中から精度高くピログルタミルペプチダーゼを抽出するため、公知のピログルタミルペプチダーゼ遺伝子の塩基配列を問い合わせ配列、上記予測遺伝子セットをデータベースとして BLASTX の検索を行った結果、ヒトのピログルタミルペプチダーゼ I (GenBank 登録番号: AJ278828) と、配列番号 1 で示される塩基配列からなる予測遺伝子が、E-value 6.1×10^{-5} で相同性を有することを認めた。したがって、配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA は、アスペルギルス・オリゼ由来のピログルタミルペプチダーゼをコードしていると考えられた。また、配列番号 1 で示される塩基配列には 1 箇所イントロンが存在し、配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードしていると考えられた。配列番号 1 の塩基配列のうち、プロモーターとして機能する領域を含むと考えられる 5' 非翻訳領域の塩基配列を配列番号 3 に、3' 非翻訳領域の塩基配列を配列番号 4 に、イントロンおよび非翻訳領域の配列を除いたコード領域の塩基配列を配列番号 5 に示した。

実施例 3 アスペルギルス・オリゼのピログルタミルペプチダーゼ cDNA のクローニング

(1) アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株の cDNA の調製

アスペルギルス・オリゼ RIB 40 株を以下の条件で培養した。DPY 培地 (2% デキストリン、2% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% リン酸一カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム 7 水) 60ml に、本菌株を接種し 300ml のバッフル付きの三角フラスコで、30℃、2 日間、150rpm で振とう培養した。培養物をろ過し得られた湿菌体 1 g を、液体窒素をいれた乳鉢に移し液体窒素で凍結後、乳棒で

微細な粉末とした。

この粉末から、アールエヌイージャー・ミディ・キット (RNeasy Midi Kit、キアゲン社製) を用いて全 RNA を取得した。

取得した全 RNA からオリゴテックス・dT30 スーパー・mRNA 精製キット (Oligotex™-dT30<Super> mRNA Purification Kit、宝酒造社製) に従い、0.6 $\mu\text{g/ml}$ の mRNA 溶液を 100 μl 取得した。この溶液に 10 μl の 3 mol/l 酢酸ナトリウム溶液 (pH5.2) と 250 μl の 99.5%エタノールを添加し、激しく攪拌後、-20℃で2時間静置した。12000rpm で20分間遠心分離後、沈殿を 200 μl の 70%エタノールで洗った後、6 μl のジエチルピロカーボネート処理水に溶解した。

回収した mRNA は、ゲートウェイ技術を用いた cDNA 合成およびクローニング用 スーパースクリプト・プラスミド・システム (SUPERSCRIP^T Plasmid System with GATEWAYTM Technology for cDNA Synthesis and Cloning、インビトロジェン社製) を用いて第1鎖 cDNA および第2鎖 cDNA の合成を行ない PCR のテンプレートに供した。

(2) PCR によるアスペルギルス・オリゼのピログルタミルペプチダーゼ cDNA のクローニングおよびピログルタミルペプチダーゼ発現用プラスミドの構築

配列番号1に示す塩基配列から設計した配列番号8および配列番号9に示す塩基配列からなるプライマーを設計し、合成した。

PCR は、上記のプライマー、テンプレートとしての(1)で調製したアスペルギルス・オリゼ cDNA、およびプレミックス Taq (Premix Taq、宝酒造社製) を用いて、プログラム・テンプ・コントロール・システム (Program Temp Control System) PC-700 (アステック社製) により行った。まず 94℃で5分間加熱しテンプレートの DNA を変性させた後、94℃で2分、56℃で30秒、72℃で1分30秒の反応を30サイクル行った。反応液を 0.8%アガロースゲルで電気泳動した結果、約 850bp の DNA 断片を検出した。

該 DNA 断片をジーンクリーン・キット (GENECLEAN Kit、Q バイオジーン社製) に従い精製した後、制限酵素 PstI および EcoRI で切断し、同様に PstI、

EcoRI で切断した原核生物発現用プラスミドベクターpRSET C (インビトロジェン社製) にライゲーションした。ライゲーションはライゲーション・キット・バージョン 2 (宝酒造社製) に従い行った。得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 [J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)] により Escherichia coli DH5 α (宝酒造社製) を形質転換し、形質転換体を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天平板培地 (1 %トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天) で選択した。

この培地上の生育株 (形質転換体) を常法により液体培養し、常法によりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを PstI および EcoRI により切断し、アガロースゲル電気泳動により挿入断片を確認した。この結果、プラスミド pRSET C の 2.9kbp の DNA 断片に加え、約 850bp の挿入断片を検出した。該プラスミドを pPGP と名づけた。pPGP は、T7 プロモーターの制御下で、配列番号 10 に示すアミノ酸配列を有する、アスペルギルス・オリゼのピログルタミルペプチダーゼの N 末にポリヒスチジン・タグを含む 41 アミノ酸が付加したポリペプチドを発現するためのプラスミドである。

実施例 4 大腸菌によるピログルタミルペプチダーゼの生産

実施例 3 (2) で構築したピログルタミルペプチダーゼ発現用プラスミド pPGP を用いて Escherichia coli BL21 をカルシウム法 [J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)] により形質転換し、形質転換体を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天平板培地 (1 %トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%寒天) で選択した。

得られた形質転換体を 60ml の LB 液体培地 (1 %トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl) に接種し、25℃で対数域まで増殖後、終濃度 1mmol/l となるようイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (以下、IPTG と略す) を添加し、さらに 25℃で 3 時間培養した。

培養後集菌し、菌体を 1 ml のリン酸緩衝液 (50mmol/l Na_2HPO_4 、0.5mol/l NaCl、pH 8) に懸濁した後、超音波破碎し、遠心により不溶性画分を除去して粗

タンパク質抽出液を得た。粗タンパク質抽出液は 1 ml の平衡化した 50%濃度の Ni-NTA レジン（インビトロジェン社製）と混合し 4℃で 30 分間インキュベート後、カラムに導入した。Ni-NTA レジンを 0.02mol/l イミダゾールを含むリン酸緩衝液 8 ml で 2 回洗浄後、0.25mol/l イミダゾールを含むリン酸緩衝液 1 ml で溶出することにより約 35kDa のタンパク質を、SDS-PAGE 上でほぼ単一のバンドとして精製した。また、プロテイン・アッセイ・キット（バイオラッド社製）により回収されたタンパク質量を求めたところ、91.8 μ g であった。

ピログルタミン酸-パラニトロアニリド（以下、PCA-pNA と略す）を基質としてピログルタミルペプチダーゼ活性の測定を行った。PCA-pNA を終濃度 5 mmol/l となるよう 50mmol/l リン酸緩衝液（pH7.5）に溶解し基質溶液とした。100 μ l の基質溶液に 20 μ l の酵素液を加え、37℃で 10 分間反応させた後、405nm の吸光度を測定した。モル吸光係数 10500 よりパラニトロアニリンの遊離量を計算し、1 単位（U）は 37℃にて 1 分間に 1 μ モルのパラニトロアニリンを遊離する量とした。上記方法にて精製タンパク質溶液の活性を測定した結果、6.6mU/ml の活性を有していた。一方、IPTG を添加しない菌体に対し同様の精製操作を行って得られた溶液の活性は 50 分の 1 以下となり、ピログルタミルペプチダーゼ活性は IPTG による発現誘導に依存的であった。したがって、pPGP に挿入された DNA 断片は、ピログルタミルペプチダーゼをコードしており、ピログルタミルペプチダーゼの製造に用いることができること、配列番号 10 で示されるアミノ酸配列（配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の N 末に 41 アミノ酸が付加したアミノ酸配列）からなるポリペプチドは、ピログルタミルペプチダーゼ活性を有することが確認された。

実施例 5 ピログルタミルペプチダーゼ作用によるタンパク質加水分解物の製造

10%の小麦グルテン（プロミック GT、協和発酵工業社製）水溶液 200ml にフレーバーザイム（ノボノルディスク社製）1.0g を添加して 48℃にて 3 日間酵素分解を行い、ろ過後、90℃で加熱処理をし、タンパク質加水分解物を得た。

実施例 4 と同様にして、pPGP を導入した Escherichia coli BL21 を培養し、

精製タンパク質溶液を調製した。得られた 0.5U のピログルタミルペプチダーゼ活性を有する精製タンパク質溶液及び 0.1g のフレーバーザイムを含む溶液を、孔径 0.2 μ m のメンブレンフィルターでろ過したタンパク質加水分解物 20ml に加え、40℃にて 2 日間酵素分解を行った（試験区 A）。上記分解物について、全窒素、遊離アミノ酸量、分解率を分析し、ピログルタミルペプチダーゼ活性を有さない溶液及びフレーバーザイムを添加した分解物（試験区 B）と比較した結果を第 1 表に示す。

第 1 表

	A	B
総窒素 (g/dl)	1.31	1.27
遊離アミノ酸 (g/dl)	0.56	0.49
分解率 (%)	68.9	62.0

上記結果から明らかなように本発明のピログルタミルペプチダーゼの添加により加水分解率の高いタンパク質分解物を得ることができる。

産業上の利用可能性

本発明により、アスペルギルス・オリゼに由来する新規なピログルタミルペプチダーゼをコードする DNA、該 DNA を用いて製造されるピログルタミルペプチダーゼが提供される。該ピログルタミルペプチダーゼを利用することにより、加水分解率の高い風味のすぐれたタンパク質分解物を得ることができる。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 6－アダプター

配列番号 7－アダプター

配列番号 8－アスペルギルス・オリゼのピログルタミルペプチダーゼ cDNA 増幅

用プライマー

配列番号 9－アスペルギルス・オリゼのピログルタミルペプチダーゼ cDNA 増幅
用プライマー

配列番号 10－配列番号 2 のアミノ酸配列の N 末にポリヒスチジンタグを含む 41
アミノ酸が付加したアミノ酸配列

請求の範囲

1. 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つのポリペプチド。
 - (a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド
 - (b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなり、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチド
 - (c) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、1 つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチド。
2. 請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA。
3. 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つの DNA。
 - (a) 配列番号 1 で示される塩基配列を含む DNA
 - (b) 配列番号 5 で示される塩基配列を含む DNA
 - (c) 配列番号 1 または 5 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつピログルタミルペプチダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA
4. 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つの DNA。
 - (a) 配列番号 3 で示される塩基配列を含む DNA
 - (b) 配列番号 3 で示される塩基配列の 100 塩基以上の長さの部分配列を含み、プロモーターとして機能する DNA
 - (c) 配列番号 3 で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、プロモーターとして機能する DNA
5. 以下の (a) から (c) のうちのいずれか 1 つの DNA。
 - (a) 配列番号 4 で示される塩基配列と相補的な塩基配列を含む DNA
 - (b) 配列番号 4 で示される塩基配列と相補的な塩基配列の 15 塩基以上の長さの部分配列を含む DNA
 - (c) 配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA

6. DNA がゲノム DNA である、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA。
7. 請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の DNA の塩基配列または該塩基配列と相補的な塩基配列の、連続する 15 塩基以上の塩基配列を含むオリゴ DNA。
8. 請求項 2 または 3 に記載の DNA を含有する組換え体 DNA。
9. 請求項 8 に記載の組換え体 DNA を含む形質転換体。
10. 請求項 1 に記載のポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする該ポリペプチドの製造方法。
11. 微生物が、請求項 9 に記載の形質転換体である請求項 10 に記載の製造方法。
12. 微生物が、糸状菌である請求項 10 に記載の製造方法。
13. 糸状菌が、アスペルギウス属、ペニシリウム属、フミコウラ属、トリコデルマ属、ムコール属およびフザリウム属からなる群から選択される 1 つの属に属する糸状菌である請求項 12 に記載の製造方法。
14. アスペルギルス属に属する糸状菌が、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・パラシテイクス、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウス、アスペルギルス・フミガタスおよびアスペルギルス・ニジュランズからなる群から選択される 1 つの種に属する糸状菌である請求項 13 に記載の製造方法。
15. タンパク質を含む原料に、請求項 1 に記載のポリペプチドおよびタンパク質加水分解酵素を添加して、タンパク質を分解することを特徴とするタンパク質加水分解物の製造方法。
16. タンパク質を含む原料に、請求項 1 に記載のポリペプチドを生産する能力を有する微生物を培地に培養して得られる、請求項 1 に記載のポリペプチドを含む培養物または該培養物の処理物、およびタンパク質加水分解酵素を添加して、タンパク質を分解することを特徴とするタンパク質加水分解物の製造方法。

17. 微生物が、請求項 9 に記載の形質転換体である請求項 16 に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

18. 微生物が、糸状菌である請求項 16 に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

19. 糸状菌が、アスペルギウス属、ペニシリウム属、フミコーラ属、トリコデルマ属、ムコール属およびフザリウム属からなる群から選択される 1 つの属に属する糸状菌である請求項 18 に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

20. アスペルギルス属に属する糸状菌が、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・パラシティクス、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウス、アスペルギルス・フミガタスおよびアスペルギルス・ニジュランズからなる群から選択される 1 つの種に属する糸状菌である請求項 19 に記載のタンパク質加水分解物の製造方法。

21. 請求項 15 から 20 のいずれか 1 項に記載の方法により製造されるタンパク質加水分解物。

22. 請求項 1 に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

23. 請求項 22 に記載の抗体を用いて請求項 1 に記載のポリペプチドを検出または定量する方法。

SEQUENCE LISTING

- <110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
National Institute of Technology and Evaluation
National Research Institute of Brewing
- <120> Pyroglutamyl peptidase and a gene thereof
- <130> A21773A
- <150> JP 2001-403261
- <151> 2001-12-27
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 2201
- <212> DNA
- <213> *Aspergillus oryzae*
- <220>
- <223> Inventor: Machida, Masayuki; Abe, Keietsu; Gomi, Katsuya;
Inventor: Asai, Kiyoshi; Sano, Motoaki; Kin, Taishin
Inventor: Nagasaki, Hideki; Hosoyama, Akira; Akita, Osamu
Inventor: Ogasawara, Naotake; Kuhara, Satoru; Tokunaga, Chikara
Inventor: Toda, Itaru; Saitoh, Chiaki; Senoh, Akihiro
- <220>
- <221> source
- <222> (1).. (2201)
- <223> /organism="Aspergillus oryzae"
/strain="RIB 40"

<220>

<221> CDS

<222> (1001)..(1111)

<220>

<221> CDS

<222> (1197)..(1901)

<220>

<221> Intron

<222> (1112)..(1196)

<223> /number=1

<400> 1

```
tcaagatctg aatgataaca gatttcctag tccattgtaa cacatcgatg gggttgacgt 60
ggtaatagaa tcccaagact gatggaaatc gttctaggtg aagtcaaagt ctagatgatg 120
aataaacaac cagactctag gaaaatgctg gtctagaccc ttgggcgaga aggaatgtgc 180
tgataacgtc tcgctgcctt tcagcggtaa cgctaataa aaagatcaac aaacaatcca 240
ggagcaacca gagcaatcgg tgcgtgttca gtaagtgagc agtgagtgca caggagcact 300
cacgtgctaa ccttacaaaa gcagcggcac ccataatcaa caggaagaag tgggccgtac 360
ggtagttcta ggaatgacata ccgaaacccc ttatttgttc gcttaaata atccctgccc 420
agctttactg atggatttct aatcgcaaag taattgggtg aaataccatc ggtattaacc 480
tagtgaatgg tgatttctaa ccatcgagta caagtcattc tcactattga actttccaaa 540
aagccccgtg aacaagcagt ctgcggtttg ccccggtga agcaaggggg aaattgtcgg 600
tcaggactcg gaacttcgga agcgaagcag aatcggcggg gcccaaaagg catgcgacgt 660
gacagcacct cacatcattc cgggacaata acatagggtc aattgcacaa ttgtctcaag 720
aacatgggtg attgtcagat tgatacgtca atcaagcttt gtgggcggtc aagatgaggg 780
gaggtcatgt gccttatcac cttatcgata tcgatatcgc gtgatgcaa gacctgcatg 840
cgggtggtgt aatgcggggg aagctccgtc gatatttga atatatttt agtccctcct 900
ctctatcctt tttgtggcgt acatagctac cgtgtatata cgaagtaaag gcgttggttc 960
```


3/14

115	120	125	
tcg att gag acc aag gcg cat cga gat tct tac cac ttg tcc gat atc			1511
Ser Ile Glu Thr Lys Ala His Arg Asp Ser Tyr His Leu Ser Asp Ile			
130	135	140	
aaa ggc aga atc ggt tat gaa gat ggg gag aag gtt tgg agg gag cag			1559
Lys Gly Arg Ile Gly Tyr Glu Asp Gly Glu Lys Val Trp Arg Glu Gln			
145	150	155	
cag ctc ccg cca gta ctc cag gct ggt cct gcg gcg gat tcc aca gac			1607
Gln Leu Pro Pro Val Leu Gln Ala Gly Pro Ala Ala Asp Ser Thr Asp			
160	165	170	
gta gta cgg aaa gtt ctc cac ccc cag ccg ccc aat gac gac ttt ctc			1655
Val Val Arg Lys Val Leu His Pro Gln Pro Pro Asn Asp Asp Phe Leu			
175	180	185	190
aac acg tgg aag tcg ttt gta tct cct gga gca gac gtc cgg ata tcc			1703
Asn Thr Trp Lys Ser Phe Val Ser Pro Gly Ala Asp Val Arg Ile Ser			
195	200	205	
gag gac gct gga cgc tac ctc tgc gag ttc atc ttt tat aca agt ctg			1751
Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Glu Phe Ile Phe Tyr Thr Ser Leu			
210	215	220	
gcc cag gcg ttt caa caa ggc cag cac cga aac gtc gtt ttc ttc cat			1799
Ala Gln Ala Phe Gln Gln Gly Gln His Arg Asn Val Val Phe Phe His			
225	230	235	
gtg cct gga tct tgc gcc gac gag gac atc gag aga ggc acg gat att			1847
Val Pro Gly Ser Cys Ala Asp Glu Asp Ile Glu Arg Gly Thr Asp Ile			
240	245	250	
gca gct gga ttg atc aaa gct ctt gta aga tgt tgg gtt agc gag cag			1895
Ala Ala Gly Leu Ile Lys Ala Leu Val Arg Cys Trp Val Ser Glu Gln			

255 260 265 270
 gta tag agcggcatgc aggttgctgg tatcgttttg caaagcaaga gcatgggcac 1951
 Val
 tggacgatat atatacttgc atttctatgg cgcgggtgcac tatctggggtt ccggatgcgc 2011
 ttttagctgc agtcactcgt gatcatttat ttatagggga cttctgtccc cggtcttttc 2071
 aggttgagtt atacatgttt cacagggtttt ggatacacta tttaccctct gactactatc 2131
 gatgaatata gacagttgtc aagcatgata ttgggttcta ccgtattcgt atatgtgtag 2191
 aatttcccgt 2201

<210> 2

<211> 271

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 2

Met Gly Asp Phe Gly Pro Pro Val Pro Ile Pro Glu Thr Glu Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Leu Ala Ser Ser Ser Leu Thr Asp Pro Glu Glu Val Ser Val Leu
 20 25 30
 Val Thr Gly Phe Gly Pro Phe Lys Thr Asn Leu Val Asn Ala Ser Tyr
 35 40 45
 Leu Ile Ala Ser Ser Leu Pro Glu Ser Leu Asp Leu Pro Ser Ala Lys
 50 55 60
 Pro Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ser Arg Arg Ile Ser Ile His Val His
 65 70 75 80
 Pro Ser Pro Ile Pro Val Ala Tyr Ser Thr Val Arg Thr Thr Ile Pro
 85 90 95
 Thr Ile Leu Glu Asp Tyr Ala Lys Ser His Gly Gly Arg Arg Pro Asp

100 105 110
Ile Val Leu His Met Gly Ile Ala Ala Thr Arg Ser Tyr Tyr Ser Ile
115 120 125
Glu Thr Lys Ala His Arg Asp Ser Tyr His Leu Ser Asp Ile Lys Gly
130 135 140
Arg Ile Gly Tyr Glu Asp Gly Glu Lys Val Trp Arg Glu Gln Gln Leu
145 150 155 160
Pro Pro Val Leu Gln Ala Gly Pro Ala Ala Asp Ser Thr Asp Val Val
165 170 175
Arg Lys Val Leu His Pro Gln Pro Pro Asn Asp Asp Phe Leu Asn Thr
180 185 190
Trp Lys Ser Phe Val Ser Pro Gly Ala Asp Val Arg Ile Ser Glu Asp
195 200 205
Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Glu Phe Ile Phe Tyr Thr Ser Leu Ala Gln
210 215 220
Ala Phe Gln Gln Gly Gln His Arg Asn Val Val Phe Phe His Val Pro
225 230 235 240
Gly Ser Cys Ala Asp Glu Asp Ile Glu Arg Gly Thr Asp Ile Ala Ala
245 250 255
Gly Leu Ile Lys Ala Leu Val Arg Cys Trp Val Ser Glu Gln Val
260 265 270

<210> 3

<211> 1000

<212> DNA

<213> *Aspergillus oryzae*

<220>

<221> source

<222> (1).. (1000)

<223> /organism="Aspergillus oryzae"

/strain="RIB 40"

<400> 3

```
tcaagatctg aatgataaca gatttcctag tccattgtaa cacatcgatg gggttgacgt    60
ggtaatagaa tcccaagact gatggaaatc gttctagggtg aagtcaaagt ctagatgatg    120
aataaacaac cagactctag gaaaatgctg gtctagaccc ttgggcgaga aggaatgtgc    180
tgataacgtc tcgctgcctt tcagcggtta cgctaactta aaagatcaac aaacaatcca    240
ggagcaacca gagcaatcgg tgcgtgttca gtaagtgagc agtgagtgca caggagcact    300
cacgtgctaa ccttacaaaa gcagcggcac ccatatcaaa caggaagaag tgggccgtac    360
ggtagttcta ggatgacata ccgaaacccc ttatttggtt gcttaaataag atccctgccc    420
agctttactg atggatttct aatcgcaaag taattgggtg aaataccatc ggtattaacc    480
tagtgaatgg tgattctcaa ccatcgagta caagtcattc tcaactattga actttccaaa    540
aagccccgtg aacaagcagt ctgcggtttg ccccggtga agcaaggggg aaattgtcgg    600
tcaggactcg gaacttcgga agcgaagcag aatcggcggg ggccaaaagg catgcgacgt    660
gacagcacct cacatcattc cgggacaata acataggttc aattgcacaa ttgtctcaag    720
aacatgggtg attgtcagat tgatacgtca atcaagcttt gtgggcggtc aagatgaggg    780
gaggtcatgt gccttatcac cttatcgata tcgatatcgc gtgatgcaa gacctgcatg    840
cggtggttgt aatgcggggg aagctccgtc gatatcttga atatatcttt agtccctcct    900
ctctatcctt tttgtggcgt acatagctac cgtgtatata cgaagtaaag gcgttgttcc    960
caccactgat tcctagcttg ccttgaccta tccactagcc    1000
```

<210> 4

<211> 300

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> source

<222> (1).. (300)

<223> /organism="Aspergillus oryzae"

/strain="RIB 40"

<400> 4

```
agcggcatgc aggttgctgg tatcgttttg caaagcaaga gcatgggcac tggacgatat    60
atatacttgc atttctatgg cgcggtgcac tatctgggtt ccggatgcgc ttttagctgc    120
agtcactcgt gatcatttat ttatagggga cttctgtccc cggtcttttc aggttgagtt    180
atacatgttt cacaggtttt ggatacacta tttaccctct gactactatc gatgaatata    240
gacagttgtc aagcatgata ttgggttcta ccgtattcgt atatgtgtag aatttcccg    300
```

<210> 5

<211> 816

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> source

<222> (1).. (816)

<223> /organism="Aspergillus oryzae"

/strain="RIB 40"

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (816)

<400> 5

```
atg gga gac ttt ggc cca ccg gtg cca ata ccc gag acg gag gta att    48
Met Gly Asp Phe Gly Pro Pro Val Pro Ile Pro Glu Thr Glu Val Ile
```

1	5	10	15	
ggg ctt gct tgc tca tct ttg aca gat cca gaa gag gtc tgc gta ctg				96
Gly Leu Ala Ser Ser Ser Leu Thr Asp Pro Glu Glu Val Ser Val Leu				
20	25	30		
gtg aca ggg ttc ggt cca ttc aag acc aac cta gtc aat gcc tgc tat				144
Val Thr Gly Phe Gly Pro Phe Lys Thr Asn Leu Val Asn Ala Ser Tyr				
35	40	45		
ttg att gcc tca tct ctg cca gag tgc ctt gac ctt cct tgc gcg aag				192
Leu Ile Ala Ser Ser Leu Pro Glu Ser Leu Asp Leu Pro Ser Ala Lys				
50	55	60		
ccg tct gga tcc ggg cct act tct cgt cgg att tca att cat gtc cat				240
Pro Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ser Arg Arg Ile Ser Ile His Val His				
65	70	75	80	
cca tgc ccc att ccc gtc gct tac tca aca gtg cgg aca act att cca				288
Pro Ser Pro Ile Pro Val Ala Tyr Ser Thr Val Arg Thr Thr Ile Pro				
85	90	95		
acc atc cta gag gat tac gcc aag tcc cat gga ggt cga cga cca gac				336
Thr Ile Leu Glu Asp Tyr Ala Lys Ser His Gly Gly Arg Arg Pro Asp				
100	105	110		
att gta ctc cat atg gga ata gcg gct aca aga tgc tac tac tgc att				384
Ile Val Leu His Met Gly Ile Ala Ala Thr Arg Ser Tyr Tyr Ser Ile				
115	120	125		
gag acc aag gcg cat cga gat tct tac cac ttg tcc gat atc aaa ggc				432
Glu Thr Lys Ala His Arg Asp Ser Tyr His Leu Ser Asp Ile Lys Gly				
130	135	140		
aga atc ggt tat gaa gat ggg gag aag gtt tgg agg gag cag cag ctc				480
Arg Ile Gly Tyr Glu Asp Gly Glu Lys Val Trp Arg Glu Gln Gln Leu				

145	150	155	160	
ccg cca gta ctc cag gct ggt cct gcg gcg gat tcc aca gac gta gta				528
Pro Pro Val Leu Gln Ala Gly Pro Ala Ala Asp Ser Thr Asp Val Val				
	165	170	175	
cgg aaa gtt ctc cac ccc cag ccg ccc aat gac gac ttt ctc aac acg				576
Arg Lys Val Leu His Pro Gln Pro Pro Asn Asp Asp Phe Leu Asn Thr				
	180	185	190	
tgg aag tcg ttt gta tct cct gga gca gac gtc cgg ata tcc gag gac				624
Trp Lys Ser Phe Val Ser Pro Gly Ala Asp Val Arg Ile Ser Glu Asp				
	195	200	205	
gct gga cgc tac ctc tgc gag ttc atc ttt tat aca agt ctg gcc cag				672
Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Glu Phe Ile Phe Tyr Thr Ser Leu Ala Gln				
	210	215	220	
gcg ttt caa caa ggc cag cac cga aac gtc gtt ttc ttc cat gtg cct				720
Ala Phe Gln Gln Gly Gln His Arg Asn Val Val Phe Phe His Val Pro				
	225	230	235	240
gga tct tgc gcc gac gag gac atc gag aga ggc acg gat att gca gct				768
Gly Ser Cys Ala Asp Glu Asp Ile Glu Arg Gly Thr Asp Ile Ala Ala				
	245	250	255	
gga ttg atc aaa gct ctt gta aga tgt tgg gtt agc gag cag gta tag				816
Gly Leu Ile Lys Ala Leu Val Arg Cys Trp Val Ser Glu Gln Val				
	260	265	270	

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> adaptor

<400> 6

cgagagcggc cgctac

16

<210> 7

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> adaptor

<400> 7

gtagcggccg ctc

13

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for amplification of *Aspergillus oryzae* pyroglutamyl pepti
dase cDNA

<400> 8

gggctgcaga tgggagactt tggcccacc

29

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer for amplification of *Aspergillus oryzae* pyroglutamyl peptidase cDNA

<400> 9

ggggaattcc tatacctgct cgctaacc

30

<210> 10

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence wherein 41 amino acids containing polyhistidine-tag are added at N-terminal of amino acid sequence of SEQ ID NO:2

<400> 10

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

20 25 30

Arg Trp Ile Arg Pro Arg Asp Leu Gln Met Gly Asp Phe Gly Pro Pro

35 40 45

Val Pro Ile Pro Glu Thr Glu Val Ile Gly Leu Ala Ser Ser Ser Leu

50 55 60

Thr Asp Pro Glu Glu Val Ser Val Leu Val Thr Gly Phe Gly Pro Phe

65 70 75 80

Lys Thr Asn Leu Val Asn Ala Ser Tyr Leu Ile Ala Ser Ser Leu Pro

85	90	95
Glu Ser Leu Asp Leu Pro Ser Ala Lys Pro Ser Gly Ser Gly Pro Thr		
100	105	110
Ser Arg Arg Ile Ser Ile His Val His Pro Ser Pro Ile Pro Val Ala		
115	120	125
Tyr Ser Thr Val Arg Thr Thr Ile Pro Thr Ile Leu Glu Asp Tyr Ala		
130	135	140
Lys Ser His Gly Gly Arg Arg Pro Asp Ile Val Leu His Met Gly Ile		
145	150	155
160		
Ala Ala Thr Arg Ser Tyr Tyr Ser Ile Glu Thr Lys Ala His Arg Asp		
165	170	175
Ser Tyr His Leu Ser Asp Ile Lys Gly Arg Ile Gly Tyr Glu Asp Gly		
180	185	190
Glu Lys Val Trp Arg Glu Gln Gln Leu Pro Pro Val Leu Gln Ala Gly		
195	200	205
Pro Ala Ala Asp Ser Thr Asp Val Val Arg Lys Val Leu His Pro Gln		
210	215	220
Pro Pro Asn Asp Asp Phe Leu Asn Thr Trp Lys Ser Phe Val Ser Pro		
225	230	235
240		
Gly Ala Asp Val Arg Ile Ser Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu Cys Glu		
245	250	255
Phe Ile Phe Tyr Thr Ser Leu Ala Gln Ala Phe Gln Gln Gly Gln His		
260	265	270
Arg Asn Val Val Phe Phe His Val Pro Gly Ser Cys Ala Asp Glu Asp		
275	280	285
Ile Glu Arg Gly Thr Asp Ile Ala Ala Gly Leu Ile Lys Ala Leu Val		
290	295	300

Arg Cys Trp Val Ser Glu Gln Val

305

310

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/57, C12N9/62, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/00, C12P21/02, C07K16/14, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/57, C12N9/62, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/00, C12P21/02, C07K16/14, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 7-298881 A (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 14 November, 1995 (14.11.95), (Family: none)	1-23
A	JP 5-137582 A (Toyobo Co., Ltd.), 01 June, 1993 (01.06.93), (Family: none)	1-23
A	WO 00/56762 A2 (NOVO NORDISK BIOTECH, INC.), 28 September, 2000 (28.09.00), & US 5807522 A	1-23
A	GOMZALES L. et al., Characterization of the pcp gene of Pseudomonas fluorescens and of its product, pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp)., Journal of Bacteriology, 1994, Vol.176, No.9, pages 2569 to 2576	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 March, 2003 (20.03.03)

Date of mailing of the international search report
08 April, 2003 (08.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13627

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Osamu GOTOH, Homology-based gene structure prediction: simplified matching algorithm using a translated codon (tron) and improved accuracy by allowing for long gaps., Bioinformatics, 2000, Vol.16, No.3, pages 190 to 202	1-23
A	Kiyoshi ASAI et al., Recognition of Human Genes by Stochastic Parsing, Pacific Symposium on Biocomputing, 1998, Vol.98, pages 228 to 239	1-23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/57, C12N9/62, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P21/02, C07K16/14, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/57, C12N9/62, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P21/02, C07K16/14, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P 7-298881 A (寶酒造株式会社) 1995. 11. 14 (ファミリーなし)	1-23
A	J P 5-137582 A (東洋紡績株式会社) 1993. 06. 01 (ファミリーなし)	1-23
A	WO 00/56762 A2 (NOVO NORDISK BIOTECH, INC.) 2000. 09. 28 &US 5807522 A	1-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 03. 03

国際調査報告の発送日

08.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GOMZALES L. et. al., Characterization of the pcg gene of Pseudomonas fluorescens and of its product, pyrrolidone carboxyl peptidase (Pcp)., Journal of Bacteriology, 1994, Vol.176, No.9, p.2569-2576	1-23
A	Osamu Gotoh, Homology-based gene structure prediction: simplified matching algorithm using a translated codon (tron) and improved accuracy by allowing for long gaps., Bioinformatics, 2000, Vol.16, No.3, p.190-202	1-23
A	Kiyoshi Asai et. al. Recognition of Human Genes by Stochastic Parsing, Pacific Symposium on Biocomputing, 1998, Vol.98, p.228-239	1-23